

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360054

研究課題名（和文） 傾斜機能性を有する骨組織再生用多孔質複合材料の力学特性と細胞増殖性に関する研究

研究課題名（英文） Mechanical properties and cell proliferation characteristic of functionally graded porous composite materials for bone tissue regeneration

研究代表者

東藤 貢 (TODO MITSUGU)

九州大学・応用力学研究所・准教授

研究者番号：80274538

研究成果の概要（和文）：

骨組織の再生治療に用いる細胞培養のための多孔体(scaffold)として強化構造を導入したポリ L 乳酸 PLLA 系 scaffold を開発した。2種類のシェル構造（緻密体と多孔体）とビーム構造を強化材とし多孔質コア部と組み合わせることで、圧縮弾性率や強度等の力学特性を大幅に向上することに成功した。さらに、骨再生能に優れるハイドロキシアパタイトや $\beta$ -TCP等の生体活性リン酸カルシウム系セラミックス微粒子を PLLA に分散させることで、細胞増殖能や ALP 活性および力学特性が大幅に向上することを見出した。PLLA 系 scaffold より力学特性は劣るが、より生体適合性に優れる生体ポリマーのコラーゲンを基材とした scaffold と $\beta$ -TCP を複合化した scaffold を開発し、間葉系幹細胞とのハイブリッド化による人工骨組織形成実験を行ったところ、複合化による細胞増殖能、骨芽細胞への分化能、力学特性の向上等を達成することができた。また、細胞培養中に圧縮力学刺激を加えることで、細胞増殖能や ALP 活性等をさらに向上させることが可能であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

PLLA based scaffolds with reinforced structures have been developed for bone tissue regeneration. Four different kinds of reinforcements, dense shell, porous shell, one beam and two beams, have been introduced and it was found that the compressive modulus and strength are dramatically improved. It was also found that addition of bioactive ceramics such as HA and  $\beta$ -TCP into the PLLA matrix greatly improve the cell proliferation and ALP activity of the scaffold. Collagen/ $\beta$ -TCP scaffold has also been developed to improve bioactivity. This composite scaffold hybridized with stem cells was found to show better cell proliferation and differentiation behavior and have higher mechanical property than pure collagen scaffold with stem cells. It was also clarified that compressive mechanical stimulus can improve the cell proliferation and ALP activity within scaffolds.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学，機械材料・材料力学

キーワード：材料設計・プロセス・物性・評価

### 1. 研究開始当初の背景

ポリL乳酸(PLLA)に代表される生分解性樹脂は，生体内での安全性も高く，代謝等により自然に吸収されるため，医療用材料として広く利用されている．たとえば，整形外科や口腔外科の分野においては，抜去のための再手術の必要がない骨折用の骨固定材として活発に利用されている．最近では，骨親和性を高めるために，骨の主成分である無機材料ハイドロキシアパタイト(HA)の微粒子をPLLAに分散させた複合材料HA/PLLAが開発され実用化が進んでいる．

一方，生体組織や臓器を再生する再生医療に対する期待はますます高まってきており，細胞を播種し増殖させるための足場材(scaffold)として吸収性材料の使用が期待されている．骨組織の再生については，主にハイドロキシアパタイト(HA)や $\beta$ -TCPなどの生体活性セラミックスが検討されているが，これらの無機材料は，優れた骨伝導能を示すものの，脆性的であり破壊エネルギーが低いため，治癒中に荷重の作用が予測されるような箇所での使用は難しい．また，骨再生用材料としては，細胞の活動を助け組織の成長を促す必要があるため多孔質構造を形成することが重要であり，無機材料や有機材料に対して多孔質構造化が検討されているが，未だ力学的適合性に優れる材料は開発されておらず，また，力学的観点からの生体材料研究も少ないのが現状である．

一例として骨再生治療について考えてみると，たとえば，骨組織欠損部に人工的に構築した組織(scaffoldと細胞を組み合わせた人工再生組織)を充填することが考えられる．もし骨損傷部が皮質骨と海綿骨の両方を含む部位で生じている場合には，骨再生用scaffoldも皮質骨と海綿骨の両方の構造を有するものが力学的・生物学的適合性に優れており，工学的には，いわゆる傾斜機能的な構造を持つ人工材料の作製が考えられる．さらに，力学的特性と生物学的適合性を最適化するような多孔質構造体の構築が重要である．

### 2. 研究の目的

前述の研究背景と本研究代表者のこれまでの研究成果を踏まえて，本研究課題では，骨欠損部位に応じて必要とされる力学特性を発現できる新規骨組織再生用多孔質材料の創製を目指した．力学特性に加えて細胞増殖能についても検討し，材料力学と生物学の

両面から新規材料について検討を行った．検討する材料としては，有機・無機系多孔質複合材料を提案し，強化構造を導入することで，力学特性を発現させることを検討した．

具体的には，強化構造を導入した生分解性ポリマーscaffoldの作製，生体活性セラミックスとの複合化による生体適合性の向上の試み，3次元有限要素法による変形メカニズムの解明を目的とした．次に，生分解性ポリマーに比べると力学特性には劣るが生体適合性に優れる生体ポリマーであるコラーゲンを用いて，生体活性セラミックスとの複合材料を作製し，間葉系幹細胞とのハイブリッド化による人工骨組織再生の基礎研究を行うことを目的とした．さらに，細胞増殖能を向上させるために圧縮刺激の影響について検討した．

### 3. 研究の方法

#### (1) 強化構造を有するscaffold

##### ① 材料作製方法

原料は生分解性ポリマーのポリL乳酸(PLLA)であり，固液相分離法と凍結乾燥法を応用して多孔質構造を作製した．溶媒には1,4-ジオキサンを用いた．強化構造としては，緻密なフィルム状シェル，多孔質状シェル，緻密なビーム構造の3種類であり，ビームとしては1本と2本構造を導入した．

次に，生体適合性と剛性を向上するために生体活性セラミックスのひとつであり臨床応用もされている $\beta$ -TCP微粒子を分散させたコア・シェル型scaffoldを作製した．

##### ② 微視構造と力学特性評価

電界放射形走査型電子顕微鏡(FE-SEM)を用いて表面を観察し，微視構造について調査した．次に圧縮試験を行い弾性率と強度を測定した．

##### ③ FEAによる変形メカニズムの解析

コア・シェル型scaffoldの変形メカニズムをコンピュータ上で再現し，特に多孔質コア部の力学状態を調べるために，scaffoldの単純化した3次元モデルを作製し，有限要素解析(FEA)法により数値解析を行った．

#### (2) 無機材料添加による細胞増殖性向上

##### ① 試験片の準備

3種類の生体活性セラミックス，ハイドロキシアパタイト(HA)， $\alpha$ -TCPおよび $\beta$ -TCPの微粒

子をPLLA中に分散させたscaffoldを作製した。溶媒であるジオキサン中にPLLAを溶解させセラミック粒子を加えてよく攪拌し分散させた後、固液相分離法と凍結乾燥法により多孔質体を作製した。また、比較のためにPLLA単体のscaffoldも作製した。

## ② 細胞培養実験

マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1をscaffold中に播種し、適切な培地中で一定期間培養し増殖させ、細胞数、ALP活性およびカルシウム量の計測、およびFE-SEMによる構造観察を行い、細胞増殖性や活性度に及ぼす生体活性セラミックの影響について評価した。

### (3) コラーゲン/無機複合系scaffold

#### ① 材料作製

I型コラーゲン水溶液に $\beta$ -TCP微粒子を分散させて、固液相分離法と凍結乾燥法により多孔質体を作製した。また、比較のためにコラーゲン単体の多孔質体を作製した。

#### ② 細胞培養実験と評価

ラット間葉系幹細胞をscaffoldに播種後、骨芽細胞分化誘導剤を加えて一定期間培養し、細胞数、ALP活性について評価した。また、圧縮試験を行い圧縮弾性率に及ぼす細胞の増殖と細胞外マトリックスの影響について検討した。また、scaffoldの微視構造、細胞外マトリックスの形成挙動を調べるためにFE-SEMによる観察を行った。

### (4) 圧縮力学刺激の影響

#### ① 材料作製

使用したscaffoldはコラーゲン製であり、多孔質構造を一方向に配向させたハニカム構造型の市販の材料を使用した。また、細胞活性を向上させるために、 $\beta$ -TCP微粒子を培地に混合しscaffoldと共に一定時間攪拌することで、scaffold表面に $\beta$ -TCPを付着させて分散させた材料を作製した。

#### ② 細胞培養実験と評価

自家製の圧縮負荷装置を使用し、scaffoldに直接繰り返し圧縮刺激を加えながら培養を行い、細胞数とALP活性を評価した。また、圧縮試験を行い弾性率を評価し、細胞培養の影響について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 強化構造を有するscaffold

強化構造を導入した4種類のscaffoldのうち、コア・シェル型scaffoldの微視構造を図1に示す。シェル構造（外層）は緻密で厚さ約200 $\mu$ mのフィルム状層であり、内側のコア層は多孔質構造を形成しており、細胞の増殖と細胞外マトリックス形成を意図している。

4種類の強化型scaffoldと強化構造を持たない通常のPLLA scaffoldの圧縮弾性率と強度を図2に示す。圧縮力学特性は、多孔質シェル、緻密シェル、1ビーム、2ビームを有するscaffoldの順に大きくなっていることがわかる。弾性率を比較すると、多孔質シェルで3.5倍程度、2ビームで7倍程度にまで上昇しており、強化構造の導入が力学特性の向上に有効であることが理解できる。

コア・シェル構造のscaffoldに対して $\beta$ -TCP粒子を分散させた3種類のscaffoldとPLLAのみのscaffoldの圧縮弾性率を比較した結果を図3に示す。シェル層への粒子添加、コア層への粒子添加、両層への粒子添加の順に弾性率は上昇しており、両層への粒子添加によりPLLAのみの場合に比べ弾性率は3倍近くにまで増加している。なお、圧縮強度についても同様の増加挙動が観察された。このように、 $\beta$ -TCP粒子の添加は生体活性の向上に加えて力学特性の向上にも効果的であることがわかった。

座屈解析を導入した3D-FEAの結果（変位分布）を図4に示す。シェル層はうねる様な波状の座屈変形を示しており、コア・シェル型scaffoldの主要な変形挙動がシェル層の座屈変形であることが理解できる。シェルは変形しているもののコア層の変形は小さく、シェル層が存在することでコア層は多孔質構造を維持できることが示唆される。このことは、コア層での細胞の増殖および組織形成がscaffoldに対する負荷で妨げられないことを意味しており、コア・シェル型scaffoldの有用性を示している。

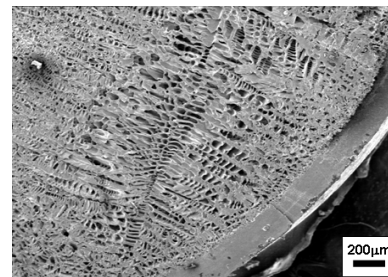


図1 コア・シェル型scaffold

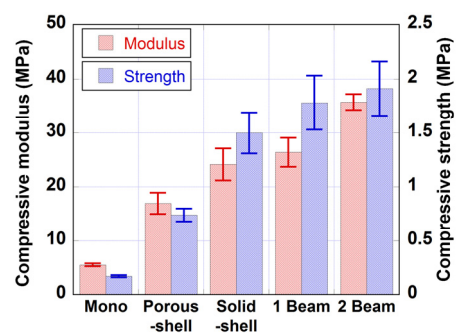


図2 強化型scaffold

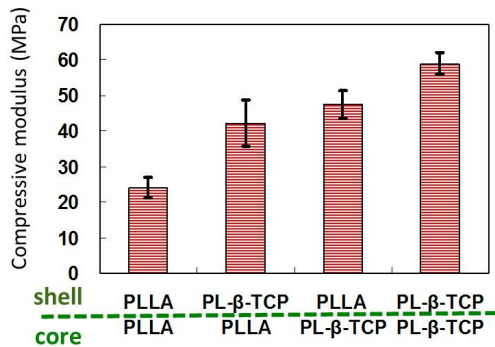


図3 複合系コア・シェル型scaffoldの弾性率の比較

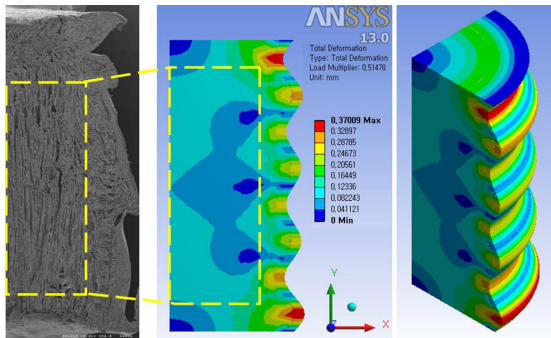


図4 FEAによる圧縮変形挙動解析結果

### (2) 無機材料添加による細胞増殖性向上

3種類のリン酸カルシウム系セラミックスの微粒子をPLLAに分散させたscaffoldとPLLA単体のscaffoldにおけるALP活性の培養に伴う変化を図5に示す。ALP活性とは骨芽細胞が行う石灰化の活性度を示す指標のひとつである。PLLA単体に比べると3種類の生体活性セラミックスを複合化することでALP活性は著しい上昇を示し、これらセラミックス粒子分散がPLLA系scaffoldの生体活性向上に効果的であることが明らかになった。

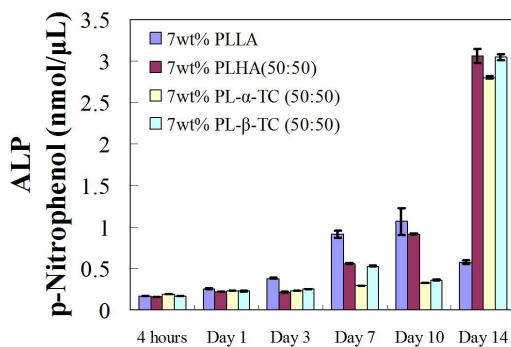


図5 ALP活性に及ぼすバイオセラミックスの影響

### (3) コラーゲン/無機複合系scaffold

コラーゲン/β-TCPとコラーゲン単体のscaffoldのみ(図中ではcontrolと表記), それらのscaffoldに間葉系幹細胞を播種したも

の計4種類の試料の圧縮弾性率の変化を図6に示す。まずコラーゲン単体のscaffoldの場合、細胞を播種しても培養日数の増加と共に弾性率は減少する傾向にある。細胞を播種したものは14日以降若干の回復を示していることがわかる。一方、β-TCPを分散させたscaffoldの場合、細胞を播種していないものでも7日後には弾性率は増加しており、その後、28日まではほぼ一定の値を示している。細胞を播種したものは、7日間で増加した後、21日まではほぼ一定の値を示すが、その後28日までは再度増加する傾向を示す。以上の結果は、β-TCPが構造安定性をもたらす弾性率を増大させること、さらに細胞を播種することで増殖に伴い細胞外マトリックスが形成され構造が強化されることで弾性率が上昇することが示唆された。

複合系scaffoldとコラーゲン単体scaffoldについて培養に伴う細胞数の変化を図7に示す。コラーゲンのみの場合、細胞数は14日までは増加するがその後一定を示している。一方、β-TCPを複合化することで28日まで細胞数は単調に増加している。このことは、β-TCPが幹細胞の増殖に有効であることを示している。

図8に28日培養したときのコラーゲン/β-TCPでの幹細胞の細胞外マトリックス形成状態を示す。幹細胞は線維状コラーゲンを生成するとともに微小なナノサイズの基質小胞を形成している。さらに、基質小胞中でアパタイトが形成されることで石灰化が生じた石灰化球の存在が確認できる。このような細胞外マトリックスの形成がscaffoldにとっては強化構造となり弾性率の上昇をもたらしたことが理解できる。

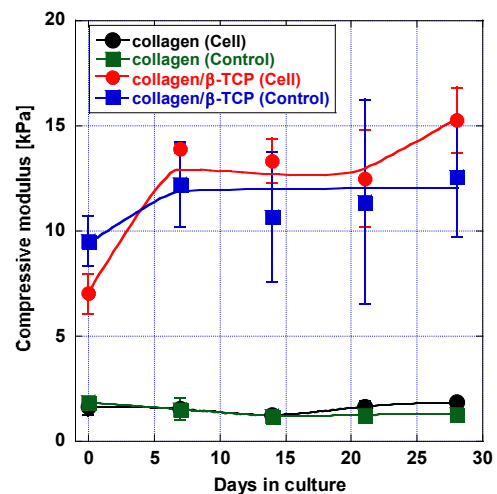


図6 培養に伴う弾性率の変化

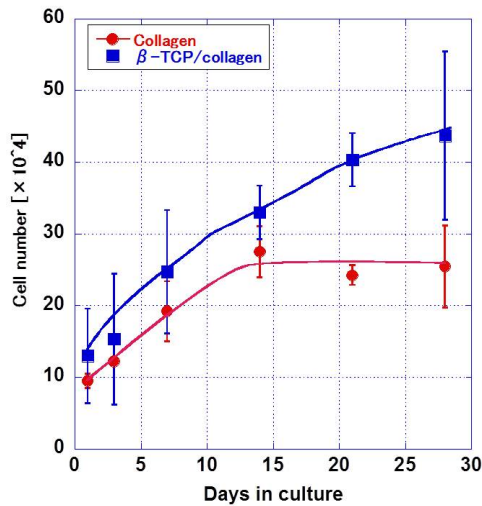


図7 培養に伴う細胞数の変化

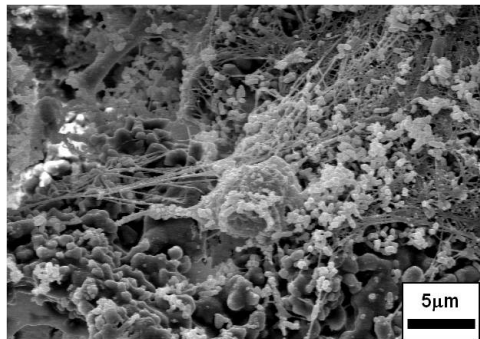


図8 幹細胞による細胞外マトリックス形成

#### (4) 圧縮力学刺激の影響

コラーゲン scaffold (ハニカム構造) と  $\beta$ -TCP 付着型コラーゲン scaffold の 2 種類, および静置培養と圧縮負荷下培養の 2 種類の計 4 種類での培養条件での細胞数の変化を図 9 に示す。圧縮負荷と  $\beta$ -TCP 微粒子の分散とともに細胞増殖に効果的であり, 圧縮刺激と  $\beta$ -TCP の両方を導入した培養が最も効果的であった。しかし, 刺激のみと  $\beta$ -TCP のみを導入した培養条件との差は小さく, 細胞の増殖がある程度飽和状態に達していることが示唆される。ただし, FE-SEM 観察の結果, 圧縮刺激と  $\beta$ -TCP の両方を導入した系において石灰化が最も進んでおり, 細胞外マトリックスの形成には両方の導入が有効であることが示された。

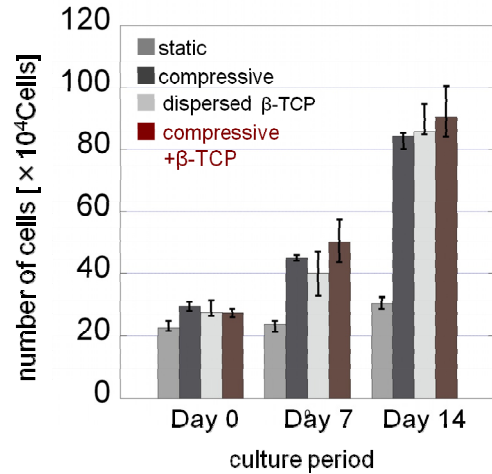


図9 細胞数に及ぼす圧縮刺激の影響

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Joo-Eon Park and Mitsugu Todo, Development and characterization of reinforced poly(L-lactide) scaffolds for bone tissue Engineering, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 査読有, 22, 2011, 1171-1182.
- ② Joo-Eon Park and Mitsugu Todo, Characterization of microstructure and compressive deformation behavior of reinforced porous poly(L-lactide), Advanced Materials Research, 査読有, 123-125, 2010, 303-306.
- ③ Joo-Eon Park and Mitsugu Todo, Development of layered porous poly(L-lactide) for bone regeneration, Journal of Materials Science, 査読有, 45, 2010, 3966-3968.
- ④ Mitsugu Todo, et al., Compressive deformation behavior of porous PLLA/PCL polymer blend, Journal of Materials Science, 査読有, 44, 2009, 4191-4194.
- ⑤ Tetsuo Takayama, Mitsugu Todo, et al., The effect of bimodal distribution on the mechanical properties of hydroxyapatite particle filled poly(L-lactide) composites, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 査読有, 2, 2009, 105-112.

[学会発表] (計 17 件)

- ① Takaaki Arahira and Mitsugu Todo, Effects of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on the mechanical characteristic of collagen/ $\beta$ -TCP composite scaffold, Orthopaedic Research Societ 2012 Annual Meeting, 2012 年 2 月 6 日, San Francisco, California, USA
- ② Mitsugu Todo and JooEon Park, Development of

- reinforced composite scaffolds for bone tissue engineering, Japan-Korea Joint Symposium: Biomechanics and Biomaterials for Hard Tissue, 2012年1月8日, Osaka
- ③ 荒平高章, 東藤貢, 骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に及ぼす生体活性セラミックスの影響, 第25回バイオエンジニアリング講演会, 2012年1月7日, 大阪
- ④ Takaaki Arahira and Mitsugu Todo, Effects of bone tissue regeneration on mechanical behavior of porous bioceramics, 4th International Conference on the Mechanics of Biomaterials and Tissues, 2011年12月13日, Hawaii, USA
- ⑤ 荒平高章, 東藤貢, コラーゲン/ $\beta$ -TCP 複合系 scaffold の力学特性に及ぼす間葉系幹細胞培養の影響, 第33回日本バイオマテリアル学会, 2011年11月21日, 京都
- ⑥ 荒平高章, 東藤貢, コラーゲン/ $\beta$ -TCP 複合系 scaffold の圧縮力学特性に及ぼす間葉系幹細胞培養の影響, 第38回日本臨床バイオメカニクス学会, 2011年11月18日, 神戸
- ⑦ Joo-Eon Park and Mitsugu Todo, Analysis of Microstructure and Compressive Deformation Behavior for Reinforced Biodegradable Porous Poly (L-lactide) Materials, The 18<sup>th</sup> International Conference on Composite Materials (ICCM 18), 2011年8月26日, Jeju, KOREA
- ⑧ Takaaki Arahira and Mitsugu Todo, The variation of mechanical characteristic of collagen scaffold with mesenchymal stem cell, The 18<sup>th</sup> International Conference on Composite Materials (ICCM 18), 2011年8月26日, Jeju, KOREA
- ⑨ Joo-Eon PARK, 東藤貢, バイオセラミックス微粒子分散ポリ L 乳酸多孔体の力学特性と細胞増殖能, 第32回日本バイオマテリアル学会大会, 2010年11月29日, 広島
- ⑩ 三宅慶彦, 荒平高章, 東藤貢, コラーゲン系 scaffold による再生骨の力学特性, 日本機械学会 2010年度年次大会, 2010年9月6日, 名古屋
- ⑪ Joo-Eon Park and Mitsugu Todo, Compressive mechanical properties and deformation behavior of PLLA/HAp and PLLA/PCL scaffolds, 平成21年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2010年3月6日, 福岡
- ⑫ 朴胃彦, 東藤貢, 複合構造化による吸収性多孔質材料の高強度化, 第22回バイオエンジニアリング講演会, 2010年1月9日, 岡山
- ⑬ 東藤貢, 複合系 scaffold の力学特性と細胞増殖の影響, 第14回骨軟部吸収性材料フォーラム, 2009年12月12日, 名古屋
- ⑭ Joo-Eon Park and Mitsugu Todo, Compressive Mechanical Properties and Microstructure of Porous PLLA/PCL Polymer Blend and PLLA/HAp Composite Material, The 4<sup>th</sup> International Symposium on Advanced Fluid/Solid science and Technology in Experimental Mechanics, 2009年11月28日, Niigata
- ⑮ Joo-Eon Park, 東藤貢, 層構造を利用した多孔質 PLLA および PLLA/HAp の力学特性制御, 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009年11月16日, 京都
- ⑯ Joo-Eon Park and Mitsugu Todo, Tailoring mechanical properties of PLLA-based scaffolds by structural control, Nano/Amorphous Materials and Interface Science Symposium, 2009年8月7日, Tohgatta, Miyagi
- ⑰ 東藤貢他, 生体吸収性複合系スキャホールドの圧縮変形挙動と細胞接着性, M&M2009 材料力学カンファレンス, 2009年7月24日, 札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東藤 貢 (TODO MITSUGU)

九州大学・応用力学研究所・准教授

研究者番号：80274538